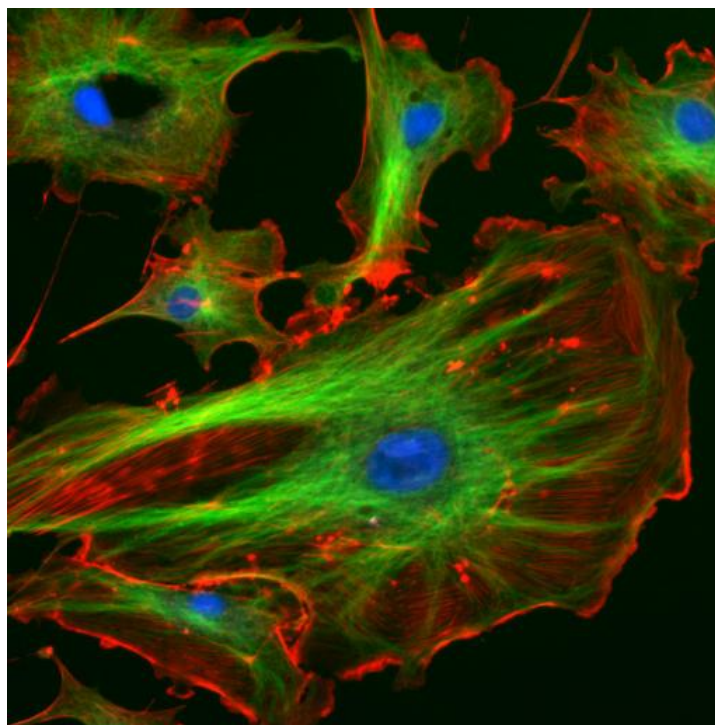


**ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ**  
**ΤΜΗΜΑ ΜΗΧΑΝΟΛΟΓΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ**

**ΕΡΓΑΣΙΑ ΣΤΟ ΜΑΘΗΜΑ ΕΜΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗ – ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΗ**  
**ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ**

**Μέθοδοι μέτρησης μηχανικών ιδιοτήτων κυττάρων και**  
**μοντέλα κυτταρικής μηχανικής συμπεριφοράς**



**Εργασία σπουδαστών:**

**Πετρόπουλος Ηλίας**

**Σωτηρόπουλος Εμμανουήλ**

**Αθήνα**  
**9/1/2013**

## Τίτλος Εργασίας

Η εικόνα της πρώτης σελίδας απεικονίζει τις ίνες (actin filaments) του κυτταροσκελετού του κυττάρου (εικόνα από Wikipedia).

## Πίνακας Περιεχομένων

1	Εισαγωγή .....	3
2	Μέθοδοι μέτρησης των μηχανικών ιδιοτήτων κυττάρων και βιομορίων– .....	3
2.1	Atomic Force Microscopy (AFM) .....	3
2.2	Optical Trapping (“optical tweezers”) .....	5
2.3	Magnetic bead microrheometry .....	7
2.4	Micropipette Aspiration .....	8
2.4.1	Λευκά Αιμοσφαίρια .....	9
2.4.2	Ερυθρά αιμοσφαίρια .....	10
3	Μοντέλα κυτταρικής μηχανικής συμπεριφοράς .....	12
3.1	Lumped parameter viscoelastic model of the cell.....	13
3.1.1	Μοντέλο Maxwell.....	14
3.1.2	Μοντέλο Kelvin .....	16
3.1.3	Συνδυαστικό μοντέλο.....	17
3.2	Tensegrity model of the cytoskeleton .....	18
3.3	Modeling actin filaments as a foam .....	20
3.4	Computational model of a chondrocyte in its matrix.....	21
4	Υπολογισμός μηχανικών χαρακτηριστικών κυττάρου με τη μέθοδο micropipette aspiration .....	23
5	Βιβλιογραφία .....	27

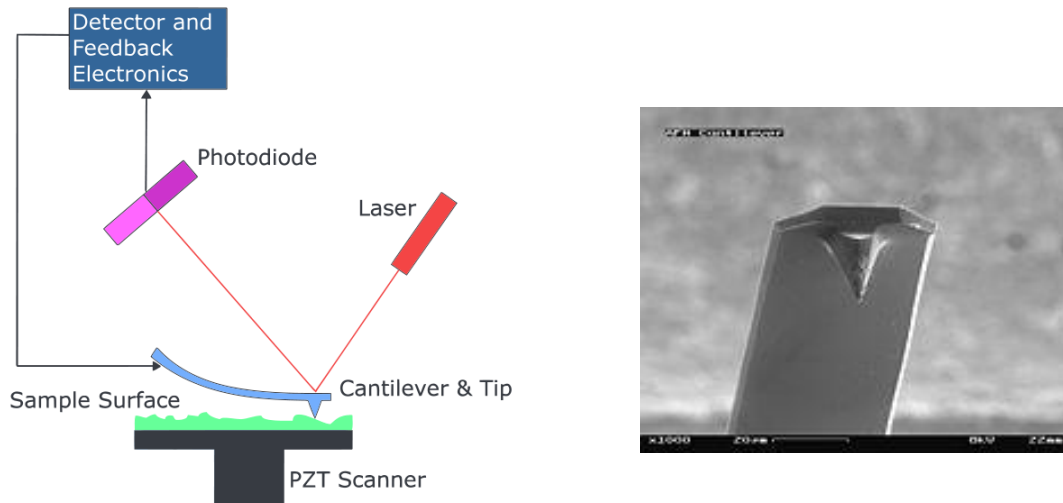
# 1 Εισαγωγή

Στην εργασία παρουσιάζονται συνοπτικά μερικές μέθοδοι υπολογισμού των μηχανικών ιδιοτήτων κυττάρων και βιομορίων όπως και τρόποι μοντελοποίησης της μηχανικής τους συμπεριφοράς. Η μέθοδος αναρρόφησης με μικροπιπέττα (micropipette aspiration) εξετάζεται πιο διεξοδικά και επαληθεύεται με βάση το πείραμα του καθηγητή Farshid Guilak[1]. Η παρουσίαση αυτών των μεθόδων έχει βασιστεί στο βιβλίο Introductory Biomechanics των C. Ross Ethier και Craig A. Simmons[2].

## 2 Μέθοδοι μέτρησης των μηχανικών ιδιοτήτων κυττάρων και βιομορίων–

### 2.1 Atomic Force Microscopy (AFM)

Η μέθοδος μετράει δυνάμεις και παραμορφώσεις/μετατοπίσεις σε μοριακή και κυτταρική κλίμακα. Ουσιαστικά είναι ένας σταδιακά μειούμενος ή σταθερός (σε διάμετρο) καθετήρας από σιλικόνη, ο οποίος είναι προσαρμοσμένος σε μια λαβίδα. Μια πακτωμένη δοκός δηλαδή, στην άκρη της οποίας υπάρχει μια μυτερή άκρη (βλ και ακόλουθα σχήματα). Η αρχή λειτουργίας στηρίζεται στο ότι όταν η άκρη (ακίδα) έρθει πολύ κοντά με την επιφάνεια που μελετάμε (κύτταρο ή μόριο στην περίπτωση μας), αναπτύσσονται δυνάμεις μεταξύ του δείγματος και της μύτης του οργάνου, γεγονός που προκαλεί την εκτροπή της δοκού σύμφωνα και με τον νόμο του Hooke. Η συγκεκριμένη εκτροπή γίνεται αντιληπτή χάρη στη μετατόπιση της κουκίδας-αποτύπωμα, της ακτίνας laser που ανακλάται στην επάνω επιφάνεια του 'χεριού', και η οποία καταλήγει σε φωτοδίοδο. Έτσι μπορούμε να μετρήσουμε μετατόπιση της ακτίνας laser μικρότερη και από 1nm.



### Μετρητική διάταξη AFM και δοκός και λεπτομέρεια του άκρου της δοκού[6]

Σημαντικό πλεονέκτημα της μεθόδου είναι ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε υδατικό περιβάλλον κυττάρου ή μορίων (δηλαδή σε περιβάλλον που πιθανότατα υπάρχει κάποιο υδατικό διάλυμα, σύνηθες για τα κύτταρα). Η μέθοδος προσομοιώνει τη δοκό σαν ένα γραμμικό ελατήριο. Η δύναμη που δέχεται η δοκός από τα μόρια υγρού αποτελεί το «θόρυβο» λόγω του υδατικού διαλύματος και υπολογίζεται από την αρχή διατήρησης ενέργειας ίση με

$$F_{spring} = \sqrt{k_B k_c T}$$

Οι δυνάμεις που είναι μικρότερες από αυτόν το θόρυβο δεν μπορούν να γίνουν αντιληπτές από τη μέθοδο αυτή [3].

Τελικά, η συγκεκριμένη μέθοδος πρέπει να αναφέρουμε πως χρησιμοποιείται κατά κύριο λόγο σαν μια τεχνική χαρτογράφησης της τοπογραφίας του κυττάρου. Για το συγκεκριμένο σκοπό έχουμε διάφορους τρόπους χρήσης του οργάνου. Οι γενικές κατηγορίες είναι δύο, η στατική(contact mode) και η δυναμική (non-contact or tapping mode), όπου ο διαχωρισμός έχει να κάνει με το αν πραγματοποιούμε σταθερή κίνηση της ακίδας (συνχά με παράλληλο σκανάρισμα raster-like pattern) ή μετακινείται ταλαντευόμενη, αντίστοιχα [4]. Με λίγα λόγια θα λέγαμε πως η στατική μέθοδος στηρίζεται στο ότι σέρνουμε τη δοκό πάνω στην επιφάνεια του κυττάρου και μετράμε απευθείας την εκτροπή της. Αντίθετα, στην δυναμική λειτουργία η δοκός μας ταλαντώνεται κοντά στην συχνότητα συντονισμού και τη φέρνουμε κοντά στο δείγμα.

Αποτέλεσμα αυτού είναι η ανάπτυξη δυνάμεων (van der Waals, δυνάμεις διπόλου, ηλεκτροστατικές), οι οποίες όμως επηρεάζουν το πλάτος ταλάντωσης ή/και τη φάση της ταλάντωσης. Από τη σύγκριση αυτής της ταλάντωσης που τελικά παίρνουμε με την εξωτερική ταλάντωση, της αναφοράς, μέσω συστήματος ελέγχου λαμβάνουμε τις πληροφορίες που χρειαζόμαστε. Παρακάτω παρουσιάζονται πιο αναλυτικά οι δύο κατηγορίες.

#### Στατική μέθοδος (contact mode):

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει σταθερή κίνηση της ακίδας (συντά με παράλληλο σκανάρισμα). Πρέπει να αναφερθεί πως σε αυτή τη μέθοδο ελλοχεύει ο κίνδυνος η ακίδα μας να τρυπήσει το κύτταρο. Η μέθοδος αυτή είναι πολύ ευάλωτη στο θόρυβο και για αυτό χρησιμοποιούνται δοκοί μικρής στιβαρότητας. Η κατακόρυφη θέση της ακίδας προσαρμόζεται μέσω συστήματος αυτομάτου ελέγχου κλειστού βρόχου, ώστε η δοκός να δέχεται διαρκώς την ίδια δύναμη και σαν ανάδραση χρησιμοποιείται το σήμα ανάκλασης της ακίδας. Στους υπολογισμούς συμπεριλαμβάνεται και η σταθερή δύναμη που υπολογίσαμε προηγουμένως και που αποτελεί το θόρυβο του συστήματος. Έτσι καθώς σαρώνουμε την επιφάνεια η δύναμη που απαιτείται για τον έλεγχο της θέσης της ακίδας μας δίνει ένα σεί τιμών ύψους της ακίδας και δύναμης που αποτελεί ουσιαστικά ένα χάρτη της μορφολογίας του κυττάρου.

#### Δυναμική μέθοδος (tapping mode):

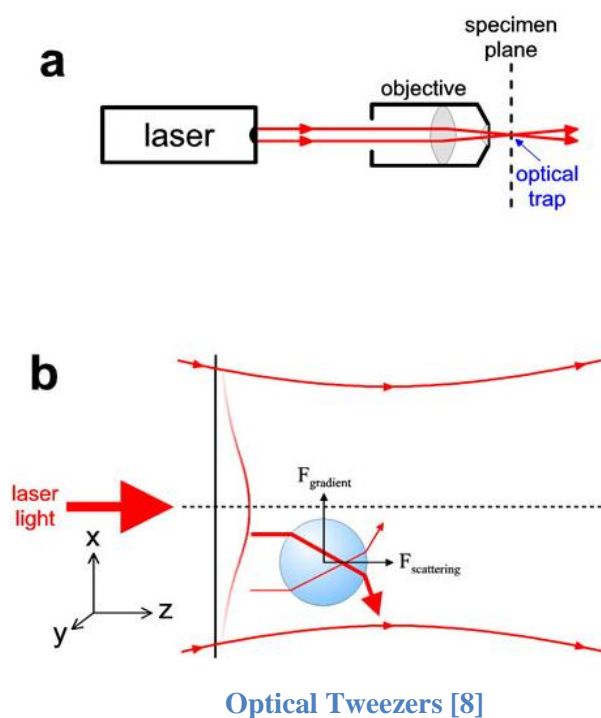
Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, στην περίπτωση αυτή αναπτύσσονται δυνάμεις van der Waals, δυνάμεις διπόλου ή ηλεκτροστατικές οι οποίες επηρεάζουν το πλάτος της ταλάντωσης του άκρου της δοκού. Συγκεκριμένα, το πλάτος μειώνεται όσο η ακίδα πλησιάζει το κύτταρο. Η διάταξη συνήθως περιλαμβάνει σερβομηχανισμό ο οποίος μέσω πιεζοηλεκτρικού επενεργητή ρυθμίζει το ύψος της ακίδας, ώστε να διατηρείται σταθερό το πλάτος της ταλάντωσης κατά τη σάρωση. Η εικόνα παράγεται με βάση τη δύναμη των διακοπόμενων επαφών της ακίδας με την επιφάνεια του κυττάρου [5].

## **2.2 Optical Trapping (“optical tweezers”)**

Η μέθοδος αυτή της οπτικής παγίδευσης μέσω μιας δέσμης laser, που συχνά καλείται και «λαβίδα laser», στηρίζεται στην φύση των

φωτονίων, τα οποία φέρουν ορμή, όπως τεκμηρίωσε ο Maxwell. Συνεπώς όταν μια δέσμη φωτός από συμβατική πηγή απορροφάται ή προσκρούει σε μία επιφάνεια, διαθλάται από μικροσκοπικά σωματίδια, τότε δημιουργούνται δυνάμεις, που ονομάζονται οπτικές δυνάμεις και οι οποίες ασκούνται πάνω στην επιφάνεια, στα σωματίδια. Η τάξη μεγέθους της συνισταμένης δύναμης είναι της τάξης των piconewtons.

Οι οπτικές δυνάμεις που προκύπτουν από τη μεταβολή της ορμής των φωτονίων της ακτινοβολίας laser είναι ικανές να επιδράσουν ισχυρά στη δυναμική μικρών ουδέτερων σωματιδίων, από τα μακροσκοπικά σωματίδια διαστάσεων μερικών μικρών μέχρι τα μόρια και τα άτομα. Αυτή η δυνατότητα επιτρέπει να παγιδεύσει κανείς σταθερά μικρά σωματίδια, να τα ανυψώσει ενάντια στη δύναμη της βαρύτητας και να τα χειρισθεί εξατομικευμένα. Ο τρόπος με τον οποίο λειτουργεί η μέθοδος αυτή λοιπόν, για τον υπολογισμό των μηχανικών ιδιοτήτων των κυττάρων, στην ουσία απλοποιείται στη διαδικασία εξισορρόπησης των οπτικών δυνάμεων που ασκούνται από τη σκέδαση και τη διάθλαση των φωτονίων της δέσμης laser στο διηλεκτρικό σωματίδιο (το κύτταρο για εμάς) από δυνάμεις που επιβάλλουμε εμείς και μπορεί να είναι διηλεκτροφόρησης, ηλεκτρικές δυνάμεις δηλαδή που ασκούνται στο σωματίδιο όταν αυτό βρεθεί σε ανομοιογενές ηλεκτρικό πεδίο, μαγνητικές ή υδροδυναμικές ανάλογα με την εφαρμογή [7]. Τελικά ο υπολογισμός αυτών των τελευταίων δυνάμεων μας επιτρέπει να εκτιμήσουμε και τις αντίστοιχες οπτικές δυνάμεις. Η πιο διαδεδομένη μέθοδος, ειδικά για τις βιοτεχνικές εφαρμογές είναι αυτή της διηλεκτροφόρησης.

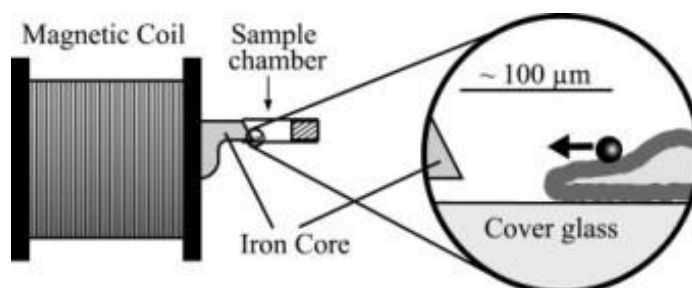


Αναλυτικότερα, με τη βοήθεια ορισμένων πρωτεϊνών προσκολλάται σωματίδιο στην επιφάνεια του κυττάρου. Η ακτίνα φωτός μετακινείται και μετράται η κίνηση του σωματιδίου. Γνωρίζοντας τα χαρακτηριστικά της οπτικής παγίδας, μπορεί να υπολογιστεί η δύναμη εξαιτίας της κινούμενης δέσμης φωτός από τη θέση του σωματιδίου ως προς το κέντρο της οπτικής παγίδας. Η μετατόπιση του σωματιδίου μετράται ταυτόχρονα, οπότε μπορεί να βρεθεί η τοπική ακαμψία του κυττάρου.

### 2.3 *Magnetic bead microrheometry*

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται ευρέως για τον υπολογισμό τοπικών μηχανικών ιδιοτήτων διαφόρων κυττάρων, αφού με τη διαδικασία αυτή έχουμε την ικανότητα να αναπτύξουμε ιδιαίτερα υψηλές και με μεγάλο εύρος, για την κυτταρική κλίμακα δυνάμεις (εύρους από 100 έως και 10000 pN). Για την υλοποίηση της μεθόδου λοιπόν, αρχικά επικαλύπτουμε ένα μικρό (διαμέτρου της τάξης των 4-5  $\mu\text{m}$ ) παραμαγνητικό σφαιρικό υλικό με κάποιο κατάλληλο μόριο, το οποίο έχει την ικανότητα πρόσδεσης με κάποια από τις πρωτεΐνες που βρίσκονται στη μεμβράνη ή στο κυτταροσκελετό του κυττάρου που θέλουμε να μελετήσουμε και συμβάλλει στην διαπερατότητά της. Έτσι δημιουργούμε ουσιαστικά μια σύνδεση μεταξύ του παραμαγνητικού μας σβώλου και του κυτταροσκελετού του κυττάρου. Έχοντας δημιουργήσει αυτή την άμεση επικοινωνία κυττάρου-σβώλου, υποβάλλουμε τα συνδεδεμένα αυτά στοιχεία σε μαγνητικό πεδίο το οποίο όπως είναι προφανές τα εκτοπίζει. Την κίνηση αυτή μπορούμε να την παρακολουθήσουμε με τη βοήθεια οπτικού μικροσκοπίου. Έχουμε λοιπόν με αυτό τον τρόπο πληροφορίες για τη μετατόπιση και την εφαρμοζόμενη δύναμη πάνω στο κύτταρο.

Όταν η δύναμη εφαρμόζεται στο σωματίδιο υπάρχει σχεδόν άμεση μετατόπισή του (φάση I) η οποία ακολουθείται από σταδιακό ερπυσμό (φάσεις II, III). Αυτό συμβαδίζει με τη συνεκτική συμπεριφορά του κυτταροσκελετού και του κυτοπλάσματος.

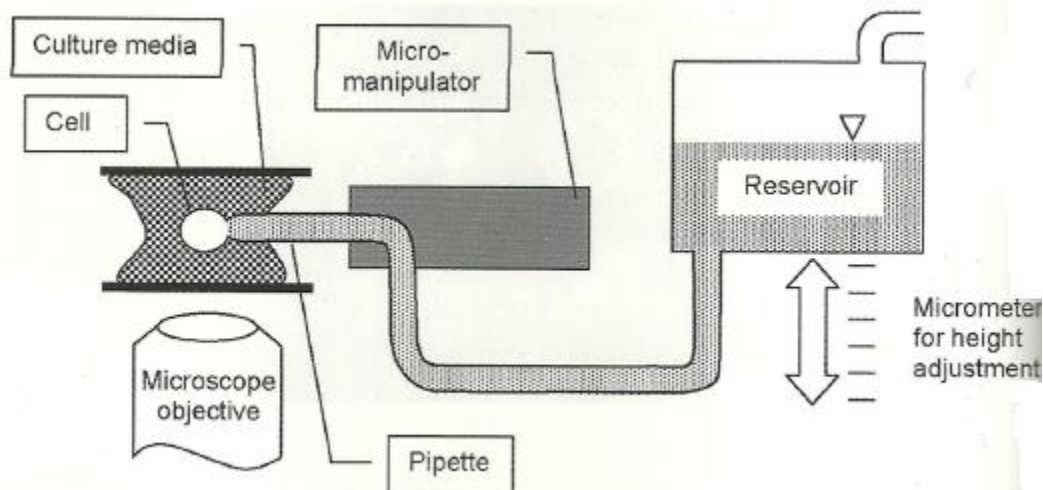


Μετρητική διάταξη magnetic bead rheometry [9]

## **2.4 Micropipette Aspiration**

Αποτελεί μία από τις παλιότερες μεθόδους, αλλά και από τις πιο αξιόπιστες όσον αφορά την μέτρηση εμβιομηχανικών ιδιοτήτων σε κυτταρική κλίμακα. Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι και τεχνικές, όλες όμως βασίζονται στην χρήση μίας γυάλινης μικροπιπέτας (micropipette), της οποίας συνήθως η εσωτερική διάμετρος έχει διαστάσεις 1-10 $\mu$ m, και η άκρη της μπορεί να κινηθεί με μικροχειρισμό. Χάρη σε ένα προσαρμοσμένο, στην μικροπιπέτα, ρεζερβουάρ γεμάτο με ρευστό, του οποίου μπορούμε να ελέγχουμε το ύψος της στάθμης, μπορούμε να μεταβάλλουμε και να καθορίζουμε την πίεση στην άκρη της μικροπιπέτας. Στην πιο απλή μορφή της, η άκρη της έρχεται σε επαφή με ένα κύτταρο. Δημιουργώντας υποπίεση στο εσωτερικό της μικροπιπέτας (μεταβάλλοντας το ύψος της στάθμης του ρεζερβουάρ) προκαλούμε μια αναρρόφηση. Η διαδικασία αυτή έχει σαν αποτέλεσμα τμήμα του κυττάρου να εισέλθει μέσα στην μικροπιπέτα. Με σύγχρονη παρακολούθηση της διαδικασίας από μικροσκόπιο παρατηρούμε σε πραγματικό χρόνο την παραμόρφωση του κυττάρου και την κίνηση του καθώς τμήμα του εισέρχεται μέσα στην μικροπιπέτα. Από τον έλεγχο του ύψους του ρευστού στο ρεζερβουάρ και από το εμβαδό της επιφάνειας της άκρης όπου και έχουμε αλληλεπίδραση, δηλαδή από την γνώση της πίεσης στην άκρη της μικροπιπέτας και της μορφολογίας του κυττάρου που εισέρχεται σε αυτήν, καθώς και του μήκους εισροής του κυττάρου στην μικροπιπέτα (aspiration length) μπορούμε να υπολογίσουμε την δύναμη που ασκείται στο κύτταρο. Μάλιστα με αυτή τη μέθοδο μπορούμε να εφαρμόσουμε δυνάμεις της τάξεως από 10 pN έως και 10<sup>4</sup>nN. Οι δυνάμεις αυτές είναι ικανοποιητικές για την μελέτη των κυττάρων αφού επιτυγχάνουμε την παραμόρφωση τους χωρίς να επέλθει καταστροφή του (lysis) . Όσον αφορά τώρα την ακρίβεια επίτευξης άσκησης της κατάλληλης δύναμης, αλλά και γενικά την επίτευξη τόσο μικρών δυνάμεων, σημαντικό ρόλο παίζει η ακρίβεια με την οποία μπορούμε να ελέγξουμε την στάθμη του ρεζερβουάρ.





**Σχηματική αναπαράσταση διάταξης για living cell - micropipette aspiration.**  
**Τα στοιχεία της διάταξης δεν απεικονίζονται σε κλίμακα [10]**

Με αυτή τη μέθοδο, έχουν μελετηθεί διάφορα κύτταρα συμπεριλαμβανόμενων των έμμορφων στοιχείων του αίματος: λευκά αιμοσφαίρια (ή λευκοκύτταρα, W.B.C or leukocytes) και τα ερυθρά αιμοσφαίρια (ή ερυθροκύτταρα, red blood cells or erythrocytes R.B.C.), αλλά και άλλα κύτταρα όπως χονδροκύτταρα (chondrocytes, που βρίσκονται στους υγής χόνδρους) και τα ενδοθηλιακά (endothelial cells). Στο σημείο αυτό θα αναλυθεί η μέθοδος τόσο πάνω στα λευκά αιμοσφαίρια όσο και πάνω στα ερυθρά κύτταρα αφού θεωρούνται αρκετά 'μαλακά' κύτταρα με έντονη παραμόρφωση και είναι από τα πλέον κατάλληλα για μελέτη μέσω micropipette aspiration.

#### **2.4.1 Λευκά Αιμοσφαίρια**

Για την είσοδο τους σε μικρής διαμέτρου τριχοειδή αγγεία, τα λευκά αιμοσφαίρια αλλάζουν σχήμα προκειμένου να χωρέσουν. Έτσι από τη σφαιρική τους μορφή, στριμώχνονται και παίρνουν ένα μακρόστενο σχήμα. Ο όγκος αυτών των δύο μορφών του κυττάρου προφανώς παραμένει ο ίδιος, αφού το κυτταρόπλασμα ουσιαστικά είναι ασυμπίεστο. Ωστόσο η επιφάνεια αυξάνεται δραστικά. Για να το επιτύχουν αυτό τα κύτταρα αυτά, χωρίς μάλιστα να καταστραφούν (lysis), πράγμα που έχει πειραματικά επιβεβαιωθεί ότι συμβαίνει όταν ξεπεράσουμε μια αύξηση-παραμόρφωση της τάξης του 4% της επιφάνειας της μεμβράνης, είναι διαμορφωμένα με περίσσεια επιφάνεια μεμβράνης η οποία είναι αναδιπλωμένη, σχηματίζοντας πτυχώσεις στο εσωτερικό του κυττάρου. Επομένως όταν χρειαστεί η μεμβράνη αυτή ξεδιπλώνεται, αλλάζοντας και τη μορφή όλου του κυττάρου. Καθ' όλη τη διάρκεια ωστόσο όπου το κύτταρο έχει σφαιρική μορφή, ο μηχανισμός

που το επιτρέπει σχετίζεται με τα φλοιώδη φορτία-τάσεις που αναπτύσσονται ομοιόμορφα στην μεμβράνη και προσδίδουν αυτό το σφαιρικό σχήμα. Γίνεται μάλιστα χρήση του νόμου Laplace, νόμος ο οποίος αποτελεί μια σχέση που συνδέει την επιφανειακή τάση και την πίεση στο εσωτερικό μιας σταγόνας ρευστού, το οποίο έχει μεμβράνη με επιφανειακή τάση πάνω της. Αντιμετωπίζουμε λοιπόν το κύτταρο σαν μια σταγόνα ρευστού (αρκετά ικανοποιητική προσέγγιση) με σφαιρική μορφή, εσωτερική πίεση ( $P_c$ , όπου έχει μονάδες δύναμης ανά επιφάνεια), ομοιόμορφη επιφανειακή τάση ( $T_c$  και μονάδες δύναμης ανά μήκος), και ακτίνα  $R_c$  (σε μονάδες μήκους). Η ανάλυση αυτή καταλήγει σε μια έκφραση που δίνει την τάση στο φλοιό από απλή μέτρηση των  $R_c$ ,  $R_p$  και  $P_p$  [11]. Η σχέση έχει διατυπωθεί για τη στιγμή όπου το aspiration length είναι ίσο με την ακτίνα της μικροπιπέττας ( $R_p$ ).

$$P_p = 2T_c \left( \frac{1}{R_c} - \frac{1}{R_p} \right) \Rightarrow T_c = \frac{P_p R_c R_p}{2(R_p - R_c)}$$

#### 2.4.2 Ερυθρά αιμοσφαίρια

Το ερώτημα που μας απασχολεί ιδιαίτερα είναι πώς το ερυθροκύτταρο αντέχει στις μεγάλες παραμορφώσεις που υπόκειται κατά τη κυκλοφοριακή ροή και ιδιαίτερα κατά την είσοδο και κυκλοφορία σε τριχοειδή αγγεία (αγγεία δηλαδή με πολύ μικρότερη διατομή από τις μεγάλες αρτηρίες). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός ότι τα κύτταρα αυτά δεν έχουν μεμβράνη που μπορεί να διπλωθεί όπως έχουν τα λευκά αιμοσφαίρια. Αυτό που τα βοηθά να αντέξουν τις παραμορφώσεις αυτές είναι το ίδιο τους το σχήμα. Ειδικότερα, τα ερυθροκύτταρα είναι απύρηντα κύτταρα με σχήμα αμφίκοιλου δίσκου, διαμέτρου περίπου 8μm. Καταφέρνει ωστόσο να εισέρχεται σε τριχοειδή αγγεία με διάμετρο 5μm ή ακόμα και διαμέσου του ενδοθηλιακού τοιχώματος που είναι τάξης μεγέθους 0.5μm.

Η συγκεκριμένη ικανότητα οφείλεται κυρίως στον τρόπο κατασκευής του, ο οποίος καταλήγει στη δημιουργία ενός κυττάρου με μία μεμβράνη ενισχυμένη με δίκτυο κυτταροσκελετού ενώ στο εσωτερικό απουσιάζει κάποια στιβαρή και οργανωμένη δομή-οργανίδιο, αλλά υπάρχει μόνο αιμοσφαιρίνη (hemoglobin Hb). Έτσι αυτή η 'σακούλα αιμοσφαιρίνης' καθίσταται αρκετά εύκαμπτη και ευέλικτη.

Ειδικότερα, για να εξετάσουμε αναλυτικότερα το πώς αντέχει το ερυθρό αιμοσφαίριο τόσο μεγάλες παραμορφώσεις ακολουθείται μια μελέτη ανάλογη με τα λευκά αιμοσφαίρια. Παρατηρείται πως κοντά στην άκρη του κυττάρου έχουμε αποτελέσματα παρόμοια με των λευκών αιμοσφαιρίων, ωστόσο σε περιοχές κοντά στην κοιλότητα που

σχηματίζεται στο κέντρο του αμφίκοιλου δίσκου, φαίνεται πως δεν υπάρχει δύναμη που να εξισορροπεί την εσωτερική πίεση. Κάτι τέτοιο όμως θα σήμαινε ότι το κύτταρο θα έπρεπε να παραμορφωθεί ή να εμφανίσει μια τέτοια τάση, το οποίο δε συμβαίνει. Συμπεραίνουμε λοιπόν πως η εσωτερική πίεση και η αντίστοιχη τάση στο φλοιό είναι μηδενικές και τελικά η μορφή αμφίκοιλου δίσκου αποτελεί την κατάσταση μηδενικής φόρτισης (stress-free state).

Η υψηλή ικανότητα παραμόρφωσης των ερυθροκυττάρων οφείλεται αφενός στη μεμβράνη τους, η οποία δεν αναδιπλώνεται και παρουσιάζει πολύ υψηλή ικανότητα κάμψης χωρίς να αυξήσει την επιφάνειά της. Επίσης οφείλεται και στο περιεχόμενο των κυττάρων, την αιμοσφαιρίνη, που είναι ασυμπίεστη, με αποτέλεσμα την διατήρηση του όγκου του κυττάρου. Οι δύο αυτές ιδιότητες, όταν αξιοποιούνται ταυτόχρονα, προσδίδοντας στο κύτταρο μεγάλη δυνατότητα αλλαγής της μορφολογίας του [11].

Ακόμα και με αυτά τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά που τα καθιστούν πολύ “μαλακά”, τα ερυθρά αιμοσφαίρια μπορούν να μελετηθούν ως προς τις μηχανικές τους ιδιότητες με τη βοήθεια της τεχνικής micropipette aspiration. Η μελέτη γίνεται όταν υπάρχει ισορροπία δυνάμεων, δηλαδή στην κατάσταση που η πίεση που επιβάλλαμε από την μικροπιπέττα διατηρείται σταθερή και η δύναμη δεν είναι τέτοια που θα προκαλέσει την καταστροφή του κυττάρου (cell rupture). Ειδικότερα, η ισορροπία αυτή είναι μεταξύ της δύναμης λόγω της πίεσης αναρρόφησης και μηχανικών τάσεων που εμφανίζονται στον κυτταροσκελετό και τη μεμβράνη. Ένας τρόπος μέτρησης των ελαστικών ιδιοτήτων του κυττάρου είναι η μέτρηση του aspiration length. Πειραματικές μετρήσεις μάλιστα μας δείχνουν πως για διάφορες δυνάμεις υπάρχει μια σχεδόν γραμμική σχέση εξάρτησης του aspiration length και της πίεσης αναρρόφησης (suction pressure).

Άλλη μια χρήσιμη ιδιότητα που μπορεί να μετρηθεί μέσω της χρήσης της μικροπιπέττας είναι η πυκνότητα της πρωτεΐνης spectrin σε συναρτήσεως της θέσης στην επιφάνεια του κυττάρου. Η πρωτεΐνη αυτή αποτελεί το δομικό στοιχείο του κυτταροσκελετού και δεν κατανομείται ομοιόμορφα στο χώρο επειδή ο κυτταροσκελετός δεν καταπονείται ομοιόμορφα, δηλαδή δεν είναι ομοιόμορφα πυκνός. Στη διαδικασία αυτή φθορίζονται συστατικά του κυτταροσκελετού και συγκρίνεται η κατανομή της φθορίζουσας ουσίας πριν και μετά τη χρήση της μικροπιπέττας [12].

### 3 Μοντέλα κυτταρικής μηχανικής συμπεριφοράς

Αρχικά αναφέρεται πως ο λόγος ύπαρξης αυτών των μοντέλων είναι διττός. Αφενός αφορά την επεξήγηση των πειραματικών μας παρατηρήσεων και μετρήσεων, αφετέρου αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο για την πρόβλεψη της συμπεριφοράς απόκρισης του κυττάρου στα διάφορα εξωτερικά ερεθίσματα. Τα τέσσερα πιο διαδομένα μοντέλα που υιοθετήσαμε και στην μελέτη μας αυτή είναι τα ακόλουθα:

Lumped parameter viscoelastic model: όπως αναφέρει και ο τίτλος στη συγκεκριμένη θεώρηση το κύτταρο θεωρείται σαν ένα σώμα, σαν ένας μικροσκοπικός σβώλος, αποτελούμενος από μία μεμβράνη που περικλείει το πρωτόπλασμα, με ικανότητα ελαστικής παραμόρφωσης. Το μοντέλο αυτό δεν λαμβάνει υπ' όψιν τη συνεισφορά των διάφορων οργανιδίων και συστατικών που απαρτίζουν ένα κύτταρο, όπως ο κυτταροσκελετός ο οποίος είναι καθοριστικός για την αντοχή και τη στιβαρότητα του κυττάρου. Επίσης η μέθοδος αυτή δε λαμβάνει υπ' όψιν το γεγονός πως το κύτταρο τις περισσότερες φορές δεν υπάρχει αυτόνομα και απομονωμένα από το περιβάλλον του, αλλά 'κατοικεί' μέσα σε μια εξωκυτταρική μήτρα (extracellular matrix).

Tensegrity model of the cytoskeleton: μια πιο μηχανική θεώρηση κατά την οποία η αρχιτεκτονική του κυττάρου, η δομή του λοιπόν στηρίζεται στον κυτταροσκελετό ο οποίος και δίνει την 3-D διάσταση και την στιβαρότητα στο κύτταρο μέσω μιας κατασκευής που χαρακτηρίζεται από tensional integrity. Με τον όρο αυτό υπονοείται πως ο κυτταροσκελετός που όπως έχουμε δει αποτελείται από ίνες ακτίνης (actin filaments) και σωληνοειδής ίνες (microtubules), αποτελεί μια διασύνδεση στοιχείων που συμπιέζονται και στοιχείων που εφελκύνονται παρέχοντας μια σταθερή δομή. Άρα λοιπόν, ο κυτταροσκελετός είναι αυτός που καθορίζει την μηχανική συμπεριφορά του κυττάρου και είναι αυτός που ουσιαστικά μοντελοποιείται.

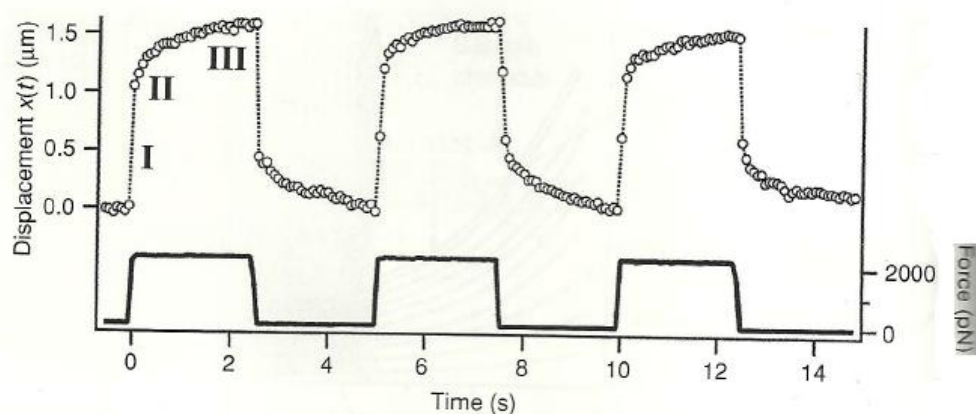
Modeling actin filaments as a foam: και σε αυτό το μοντέλο δίνεται έμφαση στον κυτταροσκελετό. Αυτός καθορίζει τη μηχανική συμπεριφορά ολόκληρου του κυττάρου. Αποτελεί μια διαφορετική προσέγγιση μοντελοποίησης του κυτταροσκελετού, σύμφωνα με την οποία η κύρια δομή του είναι ίνες ακτίνης που σχηματίζουν δίκτυα-πλέγματα που μοιάζουν με πορώδης μήτρες.

Computational model of a chondrocyte in its matrix: σε αντίθεση με όλες τις προηγούμενες μοντελοποιήσεις το κύτταρο δεν λαμβάνεται σαν να είναι απομονωμένο από το περιβάλλον, αλλά θεωρούμε την κατάσταση όπου είναι προσαρμοσμένο σε μια εξωκυτταρική μήτρα (extracellular matrix-ECM). Αυτή αποτελείται από βιοπολυμερή και ουσιαστικά καθορίζει την μηχανική συμπεριφορά. Τέλος, αναφέρεται

πως η μέθοδος αυτή βασίζεται σε πειραματικά δεδομένα και σε ανάλυση μέσω πεπερασμένων στοιχείων.

### 3.1 *Lumped parameter viscoelastic model of the cell*

Πειραματικές μετρήσεις από τη μέθοδο magnetic bead microrheometry έχουν δείξει πως για μια βηματική είσοδο-ερέθισμα δύναμης το κύτταρο θα αντιδράσει με παραμόρφωση που ακολουθεί τις γνωστές 3 φάσεις της πλαστικής παραμόρφωσης. Έτσι αρχικά παρουσιάζει μια άμεση ελαστική παραμόρφωση (phase I) και κατόπιν εμφανίζει σταδιακό ερπυσμό (παραμορφώνεται δηλαδή με το πέρασμα χρόνου και υπό σταθερή τάση, φάσεις II και III).



Τυπική απόκριση και καμπύλες χαλάρωσης για σωματίδιο διαμέτρου  $4,5\mu\text{m}$  σε μεμβράνη 3T3 ινοβλαστών (fibroblast). Έχει εφαρμοστεί παλμική δύναμη  $F=2000\text{pN}$  ανά διάστημα  $2,5\text{s}$  [13]

Όσον αφορά το ακριβές μοντέλο που χρησιμοποιούμε, αυτό περιλαμβάνει γραμμικό/ά ελατήριο/α και αποσβεστήρα/ες, όπου το κάθε στοιχείο από αυτά αντιπροσωπεύει τα ελαστικά τμήματα του κυττάρου και τα στοιχεία με έντονη συνεκτική συμπεριφορά (viscous components) αντίστοιχα. Ωστόσο η συγκεκριμένη θεώρηση είναι πολύ γενική αφού δεν μπορούμε να ξέρουμε ποια τμήματα του κυττάρου είναι τα πλήρως ελαστικά και ποια όχι, ή ακόμα δε ξέρουμε αν η συνεκτική συμπεριφορά είναι αποτέλεσμα πολλών στοιχείων ή ενός που ενεργοποιείται με διαφορετική ένταση καθώς ο χρόνος περνά.

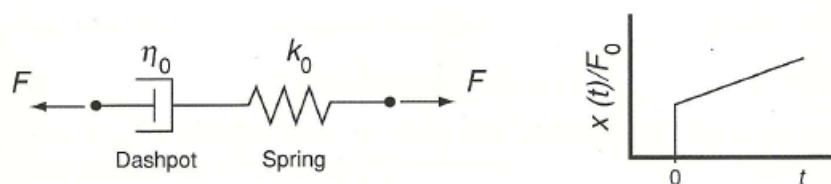
Προφανώς οι νόμοι που ισχύουν για τα μηχανικά στοιχεία μας είναι αυτοί που ξέρουμε και από την κλασική μηχανική, δηλαδή:

$$F_{spring}(t) = k_0 x_{spring}(t)$$

$$F_{dashpot}(t) = \eta_0 \dot{x}_{spring}(t)$$

υπάρχει δηλαδή μια γραμμική σχέση της δύναμης του ελατηρίου και της μετατόπισης από τη θέση φυσικού μήκους ενώ η δύναμη του αποσβεστήρα είναι ανάλογη της παραγωγού, δηλαδή της ταχύτητας παραμόρφωσης του αποσβεστήρα. Η συνολική παραμόρφωση είναι προφανώς η ζητούμενη, αφού αυτή είναι που αντιπροσωπεύει την παραμόρφωση όλου του κυττάρου. Όσον αφορά τώρα την συνδεσμολογία των μηχανικών στοιχείων που θεωρούμε ότι αποτελούν το κύτταρο, έχουμε διάφορα μοντέλα που αφορούν τόσο τον αριθμό των στοιχείων όσο και τον τρόπο σύνδεσης (παράλληλα ή γραμμικά συνδεδεμένα). Παράδειγμα τέτοιων μοντέλων είναι τα: Maxwell body (το κλασικό κατά το οποίο έχουμε ένα ελατήριο και ένα αποσβεστήρα συνδεδεμένα σε σειρά) και το Kelvin body (όπου έχουμε έναν αποσβεστήρα και ένα ελατήριο σε σειρά ενώ και τα δύο είναι σε παράλληλη σύνδεση με ένα δεύτερο ελατήριο), ενώ υπάρχουν και παραλλαγές κατά τις οποίες προσθέτουμε κι άλλα στοιχεία π.χ. άλλον ένα αποσβεστήρα σε σειρά με το σώμα Kelvin. Παρακάτω παρουσιάζονται συνοπτικά τα παραπάνω μοντέλα και οι διαφορικές τους εξισώσεις.

### 3.1.1 Μοντέλο Maxwell



Σώμα Maxwell [2]

Το μοντέλο Maxwell αποτελείται από ένα ελατήριο και έναν αποσβεστήρα σε σειρά. Η συνολική παραμόρφωση είναι το άθροισμα των παραμορφώσεων κάθε στοιχείου

$$x(t) = x_{spring}(t) + x_{dashpot}(t)$$

Αντίστοιχα, με παραγωγή της παραπάνω σχέσης ως προς το χρόνο προκύπτει πως η ταχύτητα είναι το άθροισμα των δύο ταχυτήτων. Επειδή τα στοιχεία είναι συνδεδεμένα σε σειρά, η δύναμη του ελατηρίου μεταφέρεται αυτούσια στον αποσβεστήρα δηλαδή

$$F(t) = F_{spring} = F_{dashpot}$$

Αντικαθιστώντας στις εξισώσεις στοιχείων καταλήγουμε στη διαφορική εξίσωση

$$\dot{x}(t) = \frac{1}{\eta_0} F(t) + \frac{1}{k_0} \dot{F}(t)$$

Στο σημείο αυτό χρειάζεται να διατυπωθούν οι αρχικές συνθήκες του προβλήματος. Μία πιθανότητα είναι η εφαρμογή βηματικής δύναμης (αύξηση της από το μηδέν σε μια καθορισμένη τιμή)  $F_0$ . Στην περίπτωση αυτή το ελατήριο παραμορφώνεται ακαριαία ενώ ο αποσβεστήρας δεν θα παραμορφωθεί άμεσα. Λαμβάνει πεπερασμένη τιμή ταχύτητας, αλλά η παραμόρφωση είναι μηδέν τη στιγμή  $t=0$  επειδή έχει μεσολαβήσει απειροελάχιστο χρονικό διάστημα. Εάν η δύναμη εφαρμοστεί τη στιγμή  $t=0$

, οι αρχικές συνθήκες του προβλήματος θα είναι

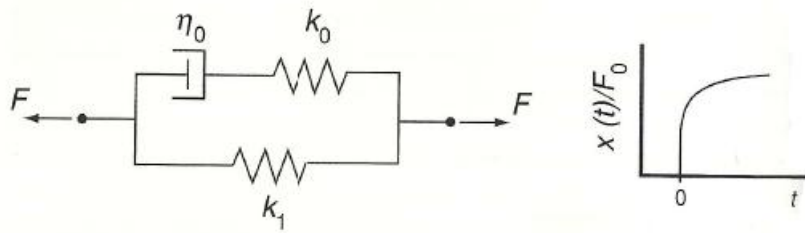
$$x(0) = \frac{F(0)}{k_0} = \frac{F_0}{k_0}$$

Για  $t > 0$  είναι  $F(t) = F_0$  και  $\dot{F} = 0$ . Η λύση της διαφορικής εξίσωσης που δίνει τη μετατόπιση του σώματος Maxwell ανά μονάδα εφαρμοζόμενης δύναμης είναι

$$\frac{x(t)}{F_0} = \frac{1}{k_0} + \frac{1}{\eta_0} t$$

Ο πρώτος όρος στο δεξί μέλος δηλώνει την άμεση απόκριση του ελατηρίου ενώ ο δεύτερος όρος δηλώνει τη γραμμική παραμόρφωση του αποσβεστήρα ως προς το χρόνο. Το μοντέλο Maxwell δεν δίνει ικανοποιητικά αποτελέσματα σε σχέση με τις πειραματικές μετρήσεις και δεν χρησιμοποιείται ευρέως.

### 3.1.2 Μοντέλο Kelvin



#### Σώμα Kelvin [2]

Το μοντέλο αυτό περιλαμβάνει ένα σώμα Maxwell παράλληλα σε ένα ελατήριο. Λόγω της παραλληλίας, η παραμόρφωση ολόκληρου του σώματος είναι ίδια με την παραμόρφωση κάθε ενός από τα δύο παράλληλα μέρη. Επομένως μπορούμε να πούμε πως η παραμόρφωση ισούται με την παραμόρφωση του σώματος Maxwell, δηλαδή

$$\dot{x}(t) = \frac{1}{\eta_0} F_{Maxwell}(t) + \frac{1}{k_0} \dot{F}_{Maxwell}(t)$$

Στην περίπτωση αυτή όμως η δύναμη ισοκατανέμεται στα δύο παράλληλα τμήματα δηλαδή είναι

$$F(t) = F_{Maxwell}(t) + F_{spring}(t)$$

Αντικαθιστώντας και αναλύοντας τη διαφορική εξίσωση της παραμόρφωσης έχουμε

$$\dot{x}(t) = \frac{1}{\eta_0} (F(t) - k_1 x(t)) + \frac{1}{k_0} (\dot{F}(t) - k_1 \dot{x}(t))$$

,η οποία λύνεται για  $t > 0$  όπου  $F(t) = F_0$  και  $\dot{F} = 0$

Η διαφορική γίνεται

$$F_0 = k_1 (x(t) + \tau \dot{x}(t))$$

, όπου  $\tau$  είναι ο χρόνος χαλάρωσης



$$\tau = \eta_0 \frac{k_0 + k_1}{k_0 k_1}$$

Όπως και προηγουμένως, δεχόμαστε πως η παραμόρφωση του αποσβεστήρα στην αρχική στιγμή είναι μηδενική οπότε τη δύναμη παραλαμβάνουν εξ ολοκλήρου τα ελατήρια. Τότε

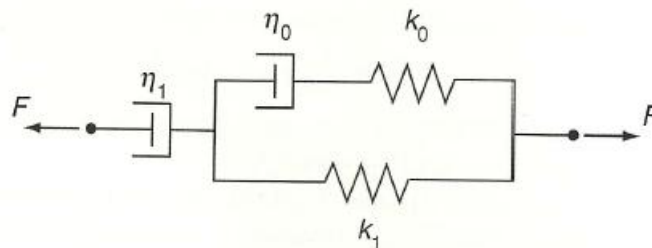
$$F_0 = k_0 x(0) + k_1 x(0)$$

Και η λύση της διαφορικής εξίσωσης είναι

$$\frac{x(t)}{F_0} = \frac{1}{k_1} \left( 1 - \frac{k_0}{k_0 + k_1} e^{-t/\tau} \right)$$

Το μοντέλο Kelvin αντιπροσωπεύει τη συμπεριφορά του κυττάρου πολύ καλύτερα σε σχέση με το μοντέλο Maxwell. Παρ' όλα αυτά παρουσιάζει ακόμη διαφοροποίηση από τις πειραματικές μετρήσεις κυρίως στη φάση ΙΙΙ.

### 3.1.3 Συνδυαστικό μοντέλο



Εικόνα συνδυαστικού μοντέλου [2]

Η πρόταση αυτή περιλαμβάνει την πρόσθεση αποσβεστήρα σε σειρά με ένα σώμα Kelvin. Δηλαδή υπάρχουν συνολικά δύο ελαστικά στοιχεία και δύο στοιχεία απόσβεσης. Η διαφορική εξίσωση του μοντέλου είναι

$$\frac{x(t)}{F_0} = \frac{1}{k_1} \left( 1 - \frac{k_0}{k_0 + k_1} e^{-t/\tau} \right) + \frac{1}{\eta_1}$$

Η θεώρηση αυτή αποτελεί άριστη προσέγγιση των πειραματικών δεδομένων που παρουσιάστηκαν στην αρχή της ενότητας [13]. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει πως πιθανότατα υπάρχουν τουλάχιστον δύο στοιχεία του κυττάρου που δίνουν ελαστική συμπεριφορά και τουλάχιστον δύο στοιχεία που δίνουν συνεκτική συμπεριφορά. Το μοντέλο όμως δεν μπορεί να αποκαλύψει ποια είναι τα στοιχεία αυτά μέσα στο κύτταρο. Επιπλέον, είναι πιθανό η συνεκτική συμπεριφορά να οφείλεται σε ένα μόνο στοιχείο, το οποίο όμως παρουσιάζει αυτή τη συμπεριφορά σε δύο διαφορετικές χρονικές κλίμακες.

Έως τώρα έχει εξετασθεί μόνο η απόκριση σε βηματική αύξηση της δύναμης. Υπάρχουν και άλλα μοντέλα που περιγράφουν την απόκριση σε διαφορετική διαταραχή, όπως σε ταλαντωτική δύναμη της μορφής

$$F(t) = F_0(1 + \sin\omega t)$$

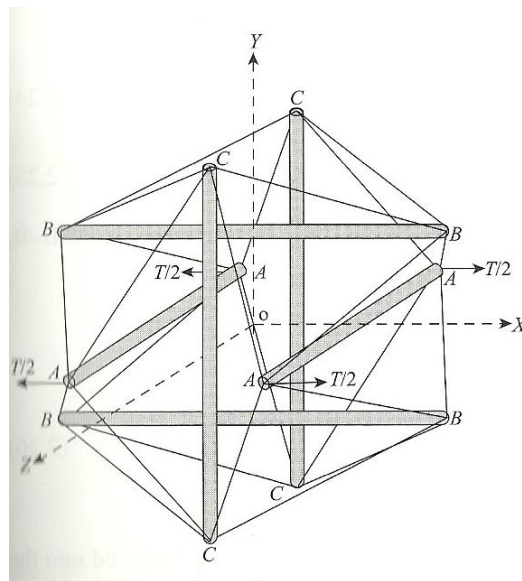
Η απόκριση σε τέτοιου είδους δύναμη δεν θα εξεταστεί στα όρια της εργασίας.

### **3.2 Tensegrity model of the cytoskeleton**

Η θεωρία αυτή είναι κυρίως μηχανική και όπως αναφέρθηκε προηγουμένως βασίζεται στη μοντελοποίηση του κυτταροσκελετού, ο οποίος θεωρούμε πως καθορίζει τις μηχανικές ιδιότητες του κυττάρου. Ο όρος tensegrity αποτελεί συντομογραφία του tensional integrity. Σύμφωνα με αυτή τη θεωρία η μηχανική ακεραιότητα του κυττάρου διατηρείται από εσωτερικά στοιχεία, τα οποία υπάγονται σε εφελκυσμό ή θλίψη. Τα στοιχεία στο εσωτερικό δεν έρχονται σε επαφή μεταξύ τους και συνδυασμός των παραμορφώσεών τους δίνει τη συνολική χωρική παραμόρφωση του κυττάρου.

Όπως προτάθηκε από τον Ingber [14] και τους συνεργάτες του, θεωρούμε πως οι ίνες ακτίνης (actin filaments) είναι τα στοιχεία εφελκυσμού και οι σωληνοειδείς ίνες (microtubules) είναι τα στοιχεία θλίψης. Η θεώρηση αυτή υποστηρίζεται εν μέρει από πειραματικά αποτελέσματα. Δηλαδή, γνωρίζουμε πως οι ίνες ακτίνης μπορούν να δεχθούν εφελκυσμό, οι σωληνοειδείς μπορούν να δεχθούν θλίψη και πως υπάρχουν διασυνδέσεις μεταξύ των δύο.

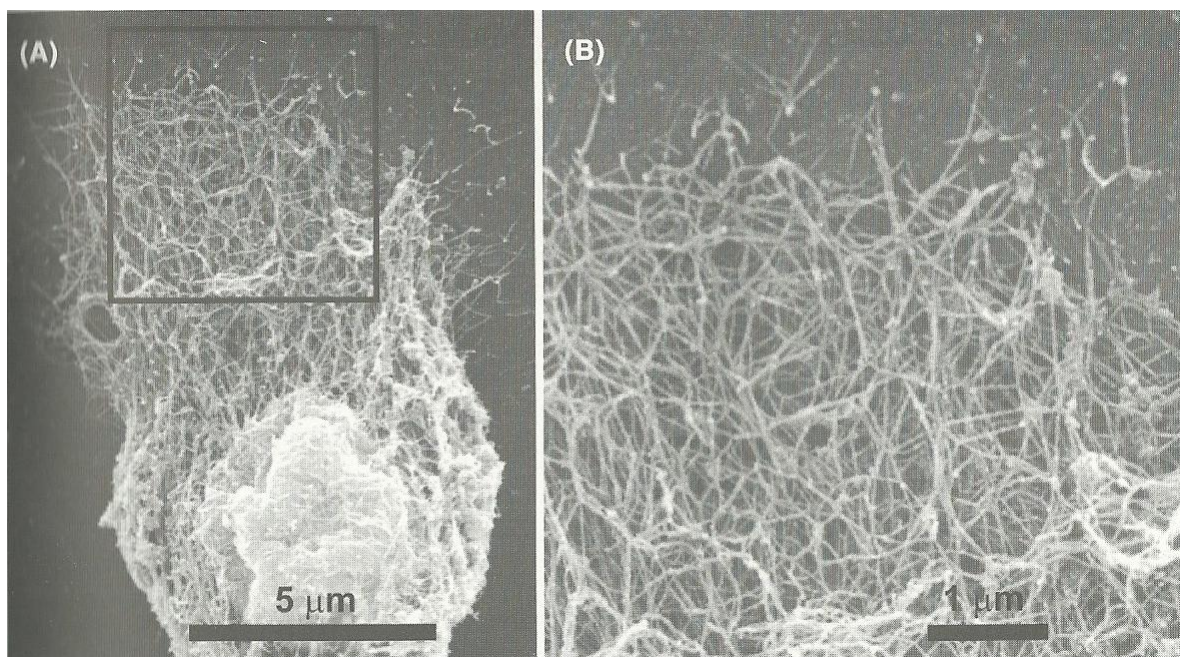
Η εφαρμογή του μοντέλου είναι δύσκολη επειδή η τοπολογία των ινών του κυτταροσκελετού και των διασυνδέσεων μεταξύ τους είναι ιδιαίτερα περίπλοκη. Για την κατανόησή του έχει χρησιμοποιηθεί μια απλοποιημένη εκδοχή, η οποία χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από τους Stamenovic και Coughlin [15]. Το κύτταρο μοντελοποιείται από 6 στοιχεία θλίψης που λέγονται struts. Αυτός είναι ο ελάχιστος αριθμός στοιχείων που δίνει ικανοποιητικό σύστημα χωρικά ισοτροπικό. Σκοπός είναι να καθορίσουμε το μέτρο ελαστικότητας του κυττάρου όταν αυτό καταπονείται από κάποια τάση. Θεωρούμε πως τα στοιχεία είναι απολύτως άκαμπτα και έχουν ίσο μήκος. Η θεωρία επεκτείνεται θεωρώντας πως τα στοιχεία εφελκυσμού συμπεριφέρονται σαν γραμμικά ελατήρια. Σημειώνεται πως όταν το κύτταρο βρίσκεται σε κατάσταση ηρεμίας, υπάρχουν ακόμη τάσεις στα στοιχεία του εσωτερικού του. Αυτό σημαίνει πως τα στοιχεία εφελκυσμού δεν βρίσκονται στο μήκος ηρεμίας τους ακόμη και όταν το κύτταρο ηρεμεί. Εικόνα του μοντέλου φαίνεται στην παρακάτω εικόνα



Απλοποιημένο tensegrity model αποτελούμενο από 6 στοιχεία θλίψης και 24 στοιχεία εφελκυσμού [15]

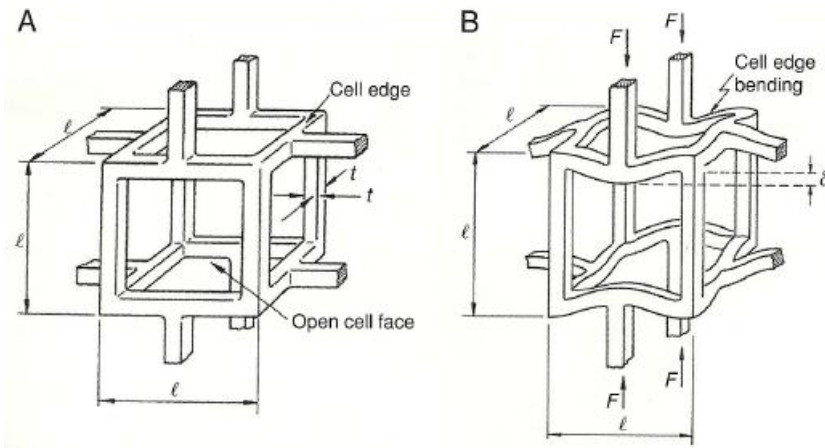
### 3.3 Modeling actin filaments as a foam

Το προηγούμενο μοντέλο δεν είναι το μόνο που έχει δημιουργηθεί για να προσεγγίσει τη δομή του κυτταροσκελετού. Στην περίπτωση αυτή γίνεται βίο-μηχανική ανάλυση κατά την οποία το δίκτυο των actin filaments και των διασυνδέσεων τους, αντιμετωπίζεται ως πορώδης στερεή μήτρα με ανοικτούς πόρους (open-celled foam). Η θεωρία της μηχανικής συμπεριφοράς για τέτοιου είδους συστήματα έχει διατυπωθεί από τους Gibson και Ashby [16]. Ο κυτταροσκελετός περιλαμβάνει μεγάλο αριθμό ινών ακτίνης συνδεόμενων μεταξύ τους. Η τοπολογία του δικτύου αυτού είναι ιδιαίτερα περίπλοκη. Παράδειγμα τέτοιας τοπολογίας φαίνεται στην παρακάτω φωτογραφία



Μικρογραφία από σαρωτή ηλεκτρονίων των actin filaments [18]

Τέτοιου είδους μικροδομή παρατηρείται επίσης σε μερικά φυσικά και συνθετικά υλικά, το χαρτί ή το βαμβάκι. Η μηχανική συμπεριφορά αυτών των υλικών προσομοιώνεται με απλοποιημένα μοντέλα όπου οι ενώσεις μεταξύ των ινών απλοποιούνται στη μορφή του επόμενου σχήματος (εικόνα A). Όταν το υλικό υπόκειται σε φόρτιση οι ίνες δέχονται φορτία και παραμορφώνονται (εικόνα B).



Απλοποιημένο μοντέλο κυττάρου σε κατάσταση ηρεμίας (A) και φόρτισης (B), όταν ασκείται δύναμη  $F$  και υπάρχει παραμόρφωση  $\delta$ . Από τους Gibson and Ashby[16]

Εφαρμόζοντας αυτό το μοντέλο, δεν συμπεριλαμβάνουμε στους υπολογισμούς το κυτόπλασμα που υπάρχει στα διάκενα ανάμεσα στις ίνες. Το μέτρο ελαστικότητας που προκύπτει από τους υπολογισμούς είναι σημαντικά μεγαλύτερο από τις περισσότερες πειραματικές μετρήσεις για ολόκληρα κύτταρα [17]. Αυτό δεν είναι αναμενόμενο μιας και από τη μορφή του δικτύου ινών θα περιμέναμε πως τα αποτελέσματα του μοντέλου θα βρίσκονται σε αποδεκτά επίπεδα. Επιπλέον, το μοντέλο αυτό δεν περιλαμβάνει άλλα στοιχεία του κυτταρικού σκελετού που μπορούν να δεχτούν φορτία, όπως οι σωληνοειδείς ίνες. Δηλαδή, η τιμή που δίνει το μοντέλο θα έπρεπε να χρησιμοποιηθεί ως κατώτατο όριο για το μέτρο του Young. Άρα, τα αποτελέσματα αντικρούονται με τα αναμενόμενα.

### 3.4 Computational model of a chondrocyte in its matrix

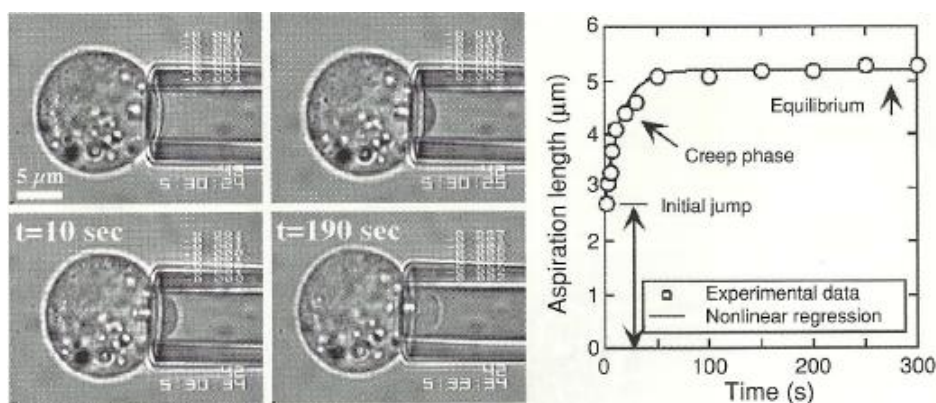
Τα προηγούμενα τρία μοντέλα περιγράφουν τις μηχανικές ιδιότητες ενός μόνο κυττάρου. Στην πραγματικότητα όμως, τα περισσότερα κύτταρα βρίσκονται μέσα σε μια εξωκυτταρική μήτρα (extracellular matrix ή ECM). Η μήτρα αυτή είναι το υλικό που παρεμβάλλεται μεταξύ των κυττάρων ενός ιστού και βοηθά στην στήριξή τους. Είναι ένα σύνθετο βιοπολυμερών και παίζει σημαντικό ρόλο στις μηχανικές ιδιότητες ενός ιστού. Εάν λοιπόν θέλουμε να υπολογίσουμε τη συμπεριφορά ενός κυττάρου όταν μια δύναμη εφαρμόζεται σε ολόκληρο τον ιστό, είναι απαραίτητο να συμπεριλάβουμε τις μηχανικές ιδιότητες της εξωκυτταρικής μήτρας.

Σαν παράδειγμα χρησιμοποιείται χονδροκύτταρο σε αρθρικό χόνδρο. Τα χονδροκύτταρα είναι υπεύθυνα για τη σύνθεση και τη συντήρηση του χόνδρου και είναι ενσωματωμένα σε εκτενή



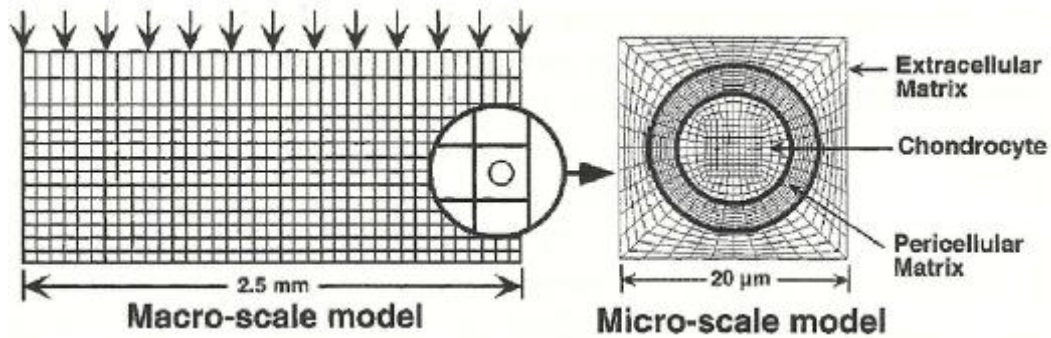
εξωκυτταρική μήτρα (ECM). Κατά τις καθημερινές δραστηριότητες δέχονται αρκετά μεγάλα φορτία. Τα χονδροκύτταρα περιβάλλονται από ειδικό συνδετικό ιστό. Μαζί, τα κύτταρα και ο συνδετικός ιστός ονομάζονται χόνδρος. Η δύναμη από όταν εφαρμόζεται στον ιστό μέχρι να μεταδοθεί στο κύτταρο, φιλτράρεται από το συνδετικό ιστό.

Τα χονδροκύτταρα μπορούν να υποβληθούν άμεσα σε μηχανική δοκιμή χρησιμοποιώντας μικροπιπέττα. Οι δοκιμές δείχνουν ότι τα χονδροκύτταρα έχουν συνεκτικές και ελαστικές (viscoelastic) ιδιότητες. Από τις μετρήσεις μπορεί να εκτιμηθεί ένα αρχικό μέτρο Young για το κύτταρο ( $E_0$ ), ένα τελικό μέτρο Young σταθερής κατάστασης ( $E_\infty$ ) και μια κυτταρική συνεκτικότητα ( $\mu$ ). Εάν η ίδια δοκιμή επαναληφθεί σε απομονωμένους πυρήνες, διαπιστώνεται ότι οι πυρήνες έχουν πολύ μεγαλύτερη δυσκαμψία από ότι ολόκληρο το κύτταρο. Αυτό σημαίνει πως για ένα εφαρμοζόμενο φορτίο, το κύτταρο δε θα παραμορφωθεί ομοιόμορφα. Μπορούμε να συμπεράνουμε πως η ανόμοια παραμόρφωση παραλαμβάνεται από τον κυτταροσκελετό.



Συνεκτική και ελαστική συμπεριφορά χονδροκυττάρων με micropipette aspiration. Βηματική είσοδος ασκήθηκε σε απομονωμένο χονδροκύτταρο και πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις του aspiration length σε σχέση με το χρόνο. Με βάση τα πειραματικά δεδομένα έγινε εκτίμηση των  $E_0$ ,  $E_\infty$ ,  $\mu$ . [19]

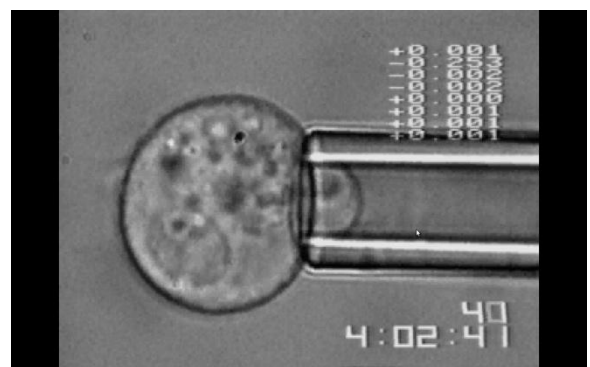
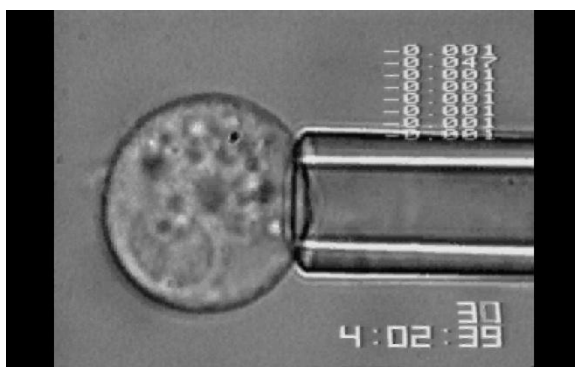
Στη συνέχεια τα δεδομένα εισάγονται σε ένα μοντέλο πεπερασμένων στοιχείων που προβλέπει την αντίδραση ενός κυττάρου σε ιστό που δέχεται καθορισμένη συμπίεση. Η τάση που δέχεται το χονδροκύτταρο εξαρτάται σε πολύ μεγάλο βαθμό από το λόγο του μέτρου Young του κυττάρου προς το μέτρο Young του ιστού. Συμπέρασμα της μεθόδου είναι πως η μηχανική συμπεριφορά του κυττάρου θα πρέπει να υπολογίζεται λαμβάνοντας υπ' όψιν πως το κύτταρο περιβάλλεται από εξωκυτταρικό υλικό.



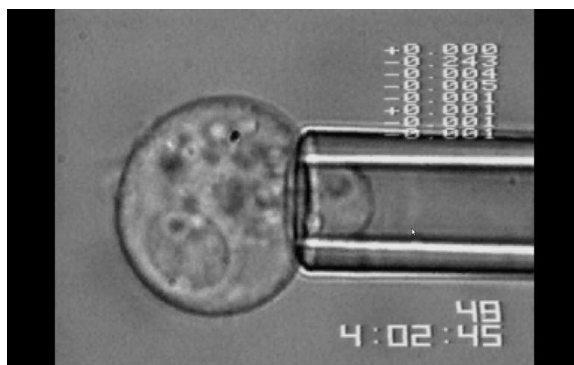
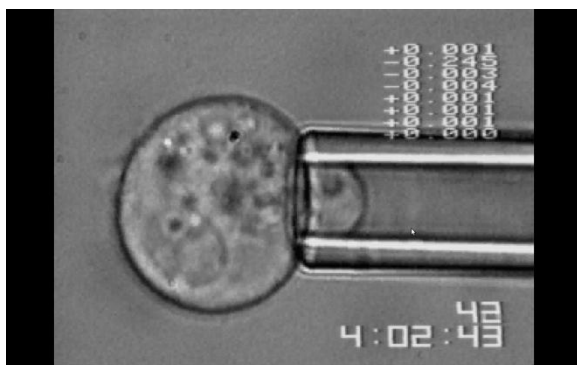
Το μηχανικό περιβάλλον ενός χονδροκυττάρου εντός της εξωκυτταρικής μήτρας προβλέπεται μέσω διφασικού μοντέλου πεπερασμένων στοιχείων. Αρχικά εξετάζεται μακροσκοπικό μοντέλο τμήματος χόνδρου υπο πίεση (αριστερά) και λαμβάνονται οι συνοριακές συνθήκες γύρω από το κύτταρο. Αυτές εισάγονται σε μικροσκοπικό μοντέλο του κυττάρου (δεξιά). Έτσι προβλέπεται η παραμόρφωση του κυττάρου όταν εφαρμόζεται θλιπτική δύναμη στον ιστό σε μακροσκοπικό επίπεδο [21]

#### 4 Υπολογισμός μηχανικών χαρακτηριστικών κυττάρου με τη μέθοδο micropipette aspiration

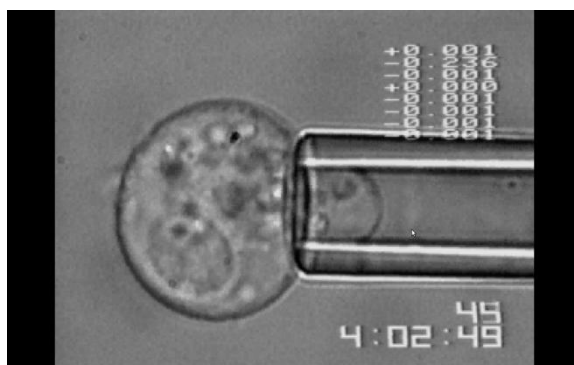
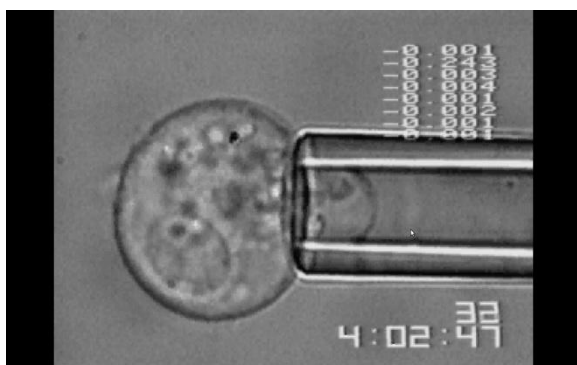
Οι υπολογισμοί βασίστηκαν στο βίντεο του πειράματος in vivo αναρρόφησης χονδροκυττάρου σε μικροπιπέττα [19], που χορηγήθηκε από τον καθηγητή Λ. Αλεξόπουλο. Από τα στιγμιότυπα της διαδικασίας μετρήθηκε το aspiration length κατά τη διάρκεια του πειράματος ( $\Delta t = 11 \text{ sec}$ ). Μετρήσεις λήφθηκαν ανά 1 sec. Στον πίνακα 1 φαίνεται το aspiration length που μετρήθηκε κάθε χρονική στιγμή. Παρουσιάζονται επίσης ορισμένα από τα στιγμιότυπα.



$t = 0 \text{ sec}$  (αριστερά) και  $t = 2 \text{ sec}$  (δεξιά)



$t = 4 \text{ sec}$  (αριστερά) και  $t = 6 \text{ sec}$  (δεξιά)



$t = 8 \text{ sec}$  (αριστερά) και  $t = 10 \text{ sec}$  (δεξιά)

Time (sec)	Aspiration length (μm)
0.00	2.0137
1.00	3.0822
2.00	4.1507
3.00	4.7260
4.00	5.0548
5.00	5.2603
6.00	5.4247
7.00	5.5890
8.00	5.6712
9.00	5.7534
10.00	5.8767
11.00	6.0000

Πίνακας 1



Για την προσομοίωση των μηχανικών ιδιοτήτων του κυττάρου χρησιμοποιείται το μοντέλο Kelvin που παρουσιάστηκε στην παράγραφο 3.1.2. Το μοντέλο περιλαμβάνει σώμα Maxwell παράλληλα με ένα ελατήριο. Περιέχει δηλαδή δύο ελαστικά στοιχεία και ένα στοιχείο απόσβεσης. Όπως αναφέρθηκε και στην παρουσίαση του, η λύση της διαφορικής του εξίσωσης είναι

$$\frac{x(t)}{F_0} = \frac{1}{k_1} \left( 1 - \frac{k_0}{k_0 + k_1} e^{-t/\tau} \right)$$

,όπου  $\tau$  είναι ο χρόνος χαλάρωσης

$$\tau = \eta_0 \frac{k_0 + k_1}{k_0 k_1}$$

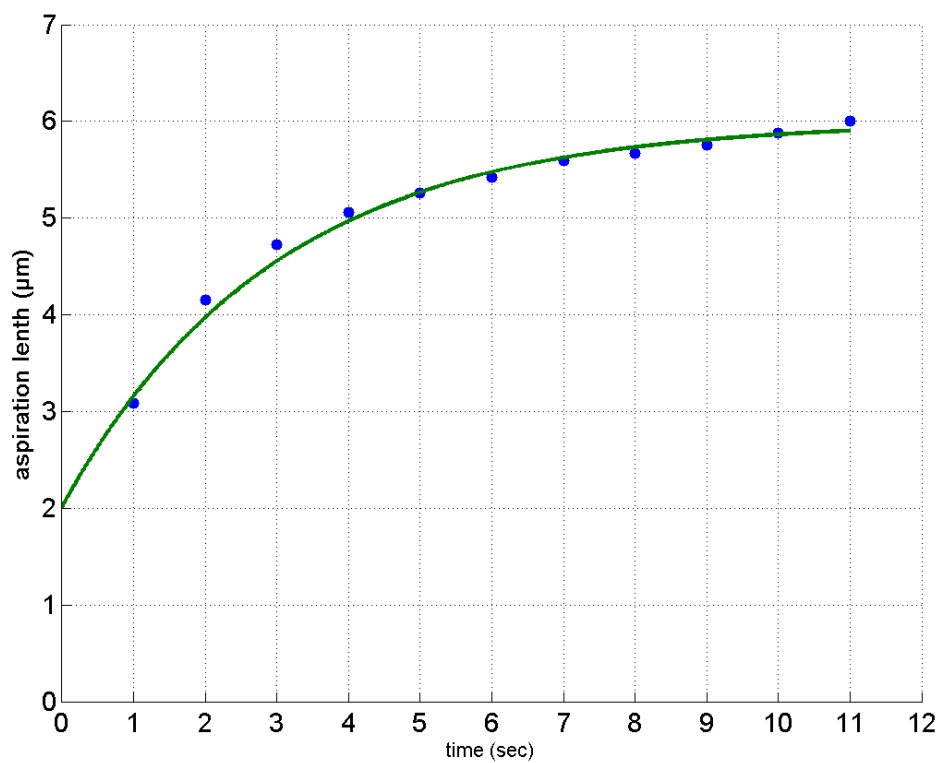
Η πίεση που εφαρμόζεται θεωρείται σταθερή και ίση με 10mm στήλης ύδατος. Η επιφάνεια αναρρόφησης της μικροπιπέτας υπολογίστηκε περίπου ίση με  $22,42 \mu m^2$ . Επομένως, η ασκούμενη δύναμη στο κύτταρο είναι σταθερή και με  $F = 2198,3 pN$ . Από την πρώτη και την τελευταία μέτρηση μπορούμε εύκολα να υπολογίσουμε τις δύο σταθερές των ελατηρίων  $k_1, k_0$ . Η μια καθορίζει το aspiration length στη μόνιμη κατάσταση και η άλλη προκύπτει από τη ζητούμενη ελαστική συμπεριφορά του κυττάρου πριν την εμφάνιση της συνεκτικής του συμπεριφοράς. Οι σταθερές υπολογίστηκαν

$$k_0 = 725,32 pN/\mu m$$

$$k_1 = 366,38 pN/\mu m$$

Απομένει μόνο ο καθορισμός της σταθεράς του αποσβεστήρα  $\eta_0$ , η οποία καθορίζει την ομαλότητα της καμπύλης στο ενδιαμέση διάστημα. Με δοκιμές καθορίζεται μια τιμή της ώστε η καμπύλη να προσεγγίζει ικανοποιητικά τις πειραματικές μετρήσεις. Στο σχήμα φαίνεται η καμπύλη του μοντέλου και τα σημεία που προέκυψαν από τη μελέτη των στιγμιότυπων. Τελικά η σταθερά αποσβεστήρα επιλέχθηκε

$$\eta_0 = 670 pNs^2/\mu m$$



Καμπύλη aspiration length σε σχέση με το χρόνο. Με πράσινη γραμμή φαίνεται η λύση της διαφορικής εξίσωσης του μοντέλου Kelvin και με μπλε σημεία φαίνονται οι πειραματικές μετρήσεις.

## 5 Βιβλιογραφία

[1]. Farshid Guilak. The deformation behavior and viscoelastic properties of chondrocytes in articular cartilage. *Biorheology*, **37** (1994), 811-819.

[2]. C. Ross Ethier, Craig A. Simmons. *Introductory Biomechanics: From Cells to Organisms*. Cambridge University Press. 2011. ISBN 978-0-521-84112-2

[3]. M. Radmacher. Measuring the elastic properties of biological samples with the AFM. *IEEE Engineering in Medicine and Biology Magazine*, **16** (1997), 45-47

[4] B. Cappella, G. Dietler, Force-distance curves by atomic force microscopy, *Surface Science Reports*, **34** (1999)

[5]. Geisse, Nicholas A. (July-August 2009). AFM and Combined Optical Techniques. *Materials Today* **12** (7-8): 40-45

[6]. Images from article: Atomic Force Microscopy, Wikipedia

[7]. Διδακτορική Διατριβή: Κοτσιφάκη Δόμνα, Οπτική παγίδα και μικροχειρισμός διηλεκτρικών σωματιδίων και βιολογικών δειγμάτων χρησιμοποιώντας δέσμες laser, Ε.Μ.Π., Αθήνα. 2012

[8]. Optical Tweezers: an Introduction, Stanford University Block Lab, <http://www.stanford.edu/group/blocklab/Optical%20Tweezers%20Introduction.htm>

[9]. Wolfgang Feneberg, Martin Aepfelbacher, Erich Sackmann. Microviscoelasticity of the Apical Cell Surface of Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC) within Confluent Monolayers, *Biophysical Journal*, **87** (August 2004).

[10]. J. Y. Shao and R. M. Hochmuth. Micropipette suction for measuring piconewton forces for adhesion and tether information from neutrophil membranes. *Biophysical Journal*. **71** (1996), 2892-2901.

[11]. Dr. Michael Sheetz. *The Cell as a Machine: Cell Biophysics and Biosystems Engineering*. Lecture 17: Cell Mechanics. Columbia University. <http://www.columbia.edu/cu/biology/courses/w3150/lecture17.pdf>

[12]. D. E. Discher, N. Mochandas and E. A. Evans. Molecular maps of red cell deformation: hidden elasticity and in situ connectivity. *Science*, **266** (1994), 1032-1035.

[13]. A. R. Bausch, F. Ziemann, A.A. Boulbitch, K. Jakobson, E. Sackmann. Local measurements of viscoelastic parameters of adherent

cell surfaces by magnetic bead microrheometry. *Biophysical Journal*, **75** (1998), 2038-2049.

[14]. D. E. Ingber. Tensegrity II. How structural networks influence cellular information processing networks. *Journal of Cell Science*, **116** (2003), 1397-1408.

[15]. D. Stamenovic and M. F. Coughlin. A quantitative model of cellular elasticity based on tensegrity. *Journal of Biomechanical Engineering*, **122** (2000), 39-43.

[16]. L. J. Gibson and M. F. Ashby. *Cellular solids: Structure and Properties*, 2<sup>nd</sup> edn (Cambridge: Cambridge University Press, 1997)

[17]. D. Stamenovic and D. E. Ingber. Models of cytoskeletal mechanics of adherent cells. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology*, **1** (2002), 95-108.

[18]. Image from [2], included with courtesy of Dr. Tarek El Sayegh, Faculty of Dentistry, University of Toronto.

[19]. Image from [2]. Included with courtesy of Professor Farshid Guilak. Reprinted from Guilak [20].

[20]. Farshid Guilak. The deformation behavior and viscoelastic properties of chondrocytes in articular cartilage. *Biorheology*, **37** (2000), 27-44.

[21]. Image from [2]. Reprinted from Guilak [20]